N° d'enregistrement
au C. N. R. S.
AO 1843

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie

LA THÈSE

DE DOCTORAT ÈS SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

par

Monsieur Robert ESNAULT

pour obtenir

le grade de Docteur Ès-Sciences

Sujet de la Thèse : Étude du mode d'action de l'auxine sur l'élongation cellulaire en rapport avec le métabolisme des protéines et des acides nucléiques.

Soutenue le 4 Décembre 1967 devant la Commission d'Examen

MM. CHOUARD *Président*
GROS, HIRTH, ULRICH *Examinateurs*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE.
Extrait du Tome 50, n° 11, 1968, p. 1887.

Printed in France.

ÉTUDE DE L'ACTION DE L'ACIDE β-INDOLYL-ACÉTIQUE (*) SUR LE MÉTABOLISME DE L'ARN DE SEGMENTS DE COLÉOPTILES D'AVOINE.

par Robert Esnault.

Laboratoire de Physiologie Végétale, 1 rue Victor-Cousin, Paris (5e).

(Mémoire reçu le 10 janvier 1968).

Résumé. — L'étude cinétique de l'incorporation du $H_8{}^{32}PO_4$ dans les ARN de segments de coléoptiles d'Avoine met en évidence une phase de latence dans l'incorporation du précurseur et dont la durée est de 40 minutes.

La présence d'AIA (*) dans le milieu d'incubation provoque des modifications prononcées du taux d'incorporation du précurseur dans les divers ARN, séparés par centrifugation en gradient de densité. A $5{,}7.10^{-5}$ M, l'AIA induit une stimulation transitoire de ce taux dans l'ARN soluble. L'analyse de la répartition de la radioactivité dans les nucléotides indique qu'il s'agit d'une stimulation de la synthèse de cet ARN et non pas d'une accélération du renouvellement du triplet terminal pCpCpA. A $2{,}85.10^{-3}$ M, l'AIA provoque, indépendamment de l'action précédente, une inhibition marquée de l'incorporation du précurseur dans l'ARN ribosomial.

L'implication de ces résultats en ce qui concerne le mode d'action de l'auxine est discutée.

En 1953, Silberger et Skoog [33] furent les premiers à mettre en évidence une influence de l'auxine sur les teneurs en acides nucléiques. Cultivés en présence d'AIA, des fragments de tige de moelle de Tabac présentent, avant l'accroissement de leur poids frais, une augmentation des teneurs en ADN et en ARN.

La plupart des travaux ultérieurs ont porté sur des organes ou des fragments d'organes qui réagissent par une élongation cellulaire à l'action des composés auxiniques.

L'évolution de l'ARN des tissus excisés mais non traités par l'auxine est intéressante à noter : les teneurs en ARN sont en constante diminution au cours du temps. Cette évolution semble générale puisqu'il est possible de l'observer dans le cas des cotylédons de germinations de Coton [1, 2],

(*) *Abréviation utilisée :* acide β-indolyl-acétique = AIA.

des mésocotyles de Maïs [32], des hypocotyles de Soja [19] et des racines de Maïs [4]. Cette diminution des teneurs en ARN serait essentiellement due à une perte en ARN ribosomial [14].

En ce qui concerne l'action de l'auxine sur le métabolisme des acides nucléiques, certains travaux souffrent d'un défaut assez grave : les temps d'incubation sont de longue durée. Tous ces résultats montrent une diminution des teneurs en ARN moins accentuée en présence des composés auxiniques. Cette augmentation apparente des quantités d'ARN s'accompagne d'une incorporation plus élevée de précurseurs radioactifs dans l'ARN. Certains auteurs ont cherché à savoir si cette augmentation était localisée dans une fraction particulière. Ainsi, KEY et SHANNON [19], après séparation en diverses fractions (nucléaire, mitochondriale, ribosomiale et soluble), montrent que l'augmentation se produit surtout au niveau des fractions ribosomiale et soluble. D'un autre côté, HAMILTON et ses collaborateurs [13], après séparation par centrifugation en gradient de concentration de saccharose de l'ARN extrait de segments de coléoptiles d'Avoine, confirment que cette augmentation est aussi élevée dans l'ARN ribosomial que dans l'ARN soluble.

Mais il est possible de se demander si cette synthèse supérieure d'ARN, après des durées d'incubation prolongées, a un lien avec le mode d'action de l'auxine. Il se pourrait, en effet, qu'elle ne soit que la résultante d'une croissance supérieure.

D'autres publications sont beaucoup plus intéressantes car elles comportent des études cinétiques de l'incorporation de précurseurs radioactifs dans l'ARN extrait de tissus traités par l'auxine. L'évolution de l'incorporation de ces précurseurs est caractérisée par l'existence d'une période de stimulation maximale. Celle-ci intervient après un temps de traitement par l'auxine de 2 à 4 h dans le cas des hypocotyles de Soja [16] et de 1 h à 1 h 30 dans le cas de segments de coléoptiles de Blé [37] ou d'Avoine [10, 36]. Cette phase est d'ailleurs suivie par une période de ralentissement du taux d'incorporation, comme l'ont souligné ESNAULT [10] et TRUELSEN et GALSTON [37].

L'emploi d'inhibiteurs des synthèses des acides nucléiques et des protéines a permis d'aboutir à la conclusion que l'auxine interviendrait dans la synthèse d'une ou de plusieurs protéines indispensables pour l'élongation cellulaire et cela par l'intermédiaire de la formation d'un ARN spécifique. Cette conclusion est basée sur le fait que la stimulation de la croissance induite par l'auxine est inhibée par ces composés. Cette inhibition est exercée par l'actinomycine D [7, 13, 23, 27], la puromycine [16, 20, 25] et le chloramphénicol [26, 28].

Cependant, l'action de ces divers composés se caractérise par l'existence d'une phase de latence. En effet, après le transfert des fragments d'organes dans les solutions d'inhibiteurs, la croissance se déroule normalement et l'inhibition n'apparaît qu'après une durée de traitement variable avec le matériel étudié. Il ne semble cependant pas que cette phase de latence soit liée à la vitesse de pénétration de ces composés à l'inté-

rieur des cellules. Cette phase de latence est généralement interprétée comme la preuve de l'existence, à l'intérieur des cellules, d'une certaine quantité d'un ARN particulier qui permettrait une croissance normale. Une fois cet ARN épuisé, les inhibiteurs deviendraient opérant en bloquant les synthèses d'ARN ou de protéines.

Cette interprétation semble confirmée par le fait que certains inhibiteurs bloquent partiellement l'incorporation de précurseurs dans l'ARN alors que la croissance n'est pas modifiée [18]. Cette observation a conduit KEY et INGLE [18] à rechercher quel était le type d'ARN responsable de cette situation. Par l'emploi combiné de 5-fluoro-uracile et d'actinomycine D, ces auteurs aboutissent à la conclusion qu'il existerait, dans les tissus d'hypocotyles de Soja, une fraction d'ARN, résistante à l'action de la 5-fluoro-uracile mais sensible à celle de l'actinomycine D, dont l'importance est suffisante pour permettre une croissance pendant une durée de 1 à 2 heures. Il semblerait que cet ARN soit l'ARN messager. Mais il est nécessaire de remarquer que d'après les résultats de CHERRY et VAN HUYSTE [5] et LEAVER et KEY [21], l'ARN soluble comprendrait une fraction non sensible à l'action de 5-fluoro-uracile.

Tous ces travaux montrent donc la nécessité d'une synthèse d'ARN pour que la croissance induite par l'auxine puisse se dérouler, ce qui semble confirmé par l'emploi d'analogues pyrimidiques [17].

Il est possible de se demander si la stimulation transitoire de la synthèse d'ARN, observée lors des études cinétiques d'incorporation de précurseurs radioactifs dans l'ARN de tissus traités par des composés auxiniques [10, 16, 37], ne pourrait pas correspondre à la synthèse dont la nécessité a été démontrée par l'emploi d'inhibiteurs tels que actinomycine D, chloramphénicol et puromycine. L'objet du présent travail est donc de déterminer la nature de l'ARN dont la synthèse est stimulée pendant les premières heures de l'action de l'auxine.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

A. — *Matériel.*

Le matériel utilisé est constitué par des segments de coléoptiles d'*Avena sativa*, variété Brighton (produite et fournie gracieusement par la station de Weibul, Suède). Les segments de coléoptiles, d'une longueur de 10 mm, sont prélevés à 3 mm du sommet des coléoptiles lorsque ceux-ci ont atteint une taille de 3 cm. Ils sont défeuillés, puis mis à incuber dans un milieu tamponné, selon NITSCH et NITSCH [24], contenant 2 p. 100 de saccharose. Ce milieu peut en outre contenir de l'AIA aux concentrations de $5{,}7.10^{-5}$ M et $2{,}85.10^{-3}$ M, respectivement stimulatrice et inhibitrice de la croissance.

B. — *Techniques d'extraction et de caractérisation des acides ribonucléiques.*

1°) *Techniques d'extraction.*

Toutes les opérations qui vont être décrites sont effectuées à la température de 4°C.

Les segments sont broyés au moyen d'un homogénéiseur Virtis, dans un tampon acétate 0,1 M, pH 5,0, NaCl 0,1 M en présence de bentonite (concentration finale : 1 p. 100). Le broyat est ensuite agité en présence d'un volume égal de phénol (distillé sur poudre de zinc) à 90 p. 100 et de laurylsulfate de sodium (concentration finale : 3 p. 100). Après centrifugation et récupération de la phase aqueuse, la phase phénolique est rincée par 10 ml de tampon et centrifugée à nouveau. Les phases aqueuses sont mélangées et les acides nucléiques précipités par l'addition de 1/10 du volume final d'acétate de potassium à 20 p. 100 (concentration finale : 2 p. 100) et de 2 volumes d'éthanol absolu. Cette précipitation est renouvelée deux fois avant l'utilisation des acides nucléiques.

2°) *Séparation de l'ARN ribosomial.*

Au début de la série d'expériences décrites dans cet article, le ^{32}P utilisé était sous forme de phosphate disodique en solution isotonique. Lors d'une incorporation de longue durée, la redissolution finale du précipité s'est avérée impossible. La centrifugation, en gradient de concentration de saccharose, de la solution surnageante, ainsi obtenue, a montré que l'ARN qui ne s'était pas redissous était l'ARN ribosomial.

L'étude expérimentale des divers facteurs qui auraient pu être responsables de ce comportement, a permis d'attribuer au NaCl la précipitation sélective de l'ARN ribosomial. L'application systématique de cette précipitation a nécessité, dans le cas de notre matériel, une mise au point qui aboutit au protocole suivant :

— dissolution de l'ARN (après les trois précipitations précédentes) dans 0,5 ml de tampon (quantité approximative d'ARN : 1 mg) ;

— addition de 0,15 ml de NaCl 4 M (concentration finale : 1 M) ;

— contact pendant une nuit ;

— centrifugation ;

— lavage (2 fois) par 1 ml de tampon acétate, NaCl 1 M ;

— lavage par 2 ml d'alcool absolu.

Le surnageant et les solutions aqueuses de lavage constituent la fraction « soluble » et le culot, la fraction « ribosomiale ».

3°) *Caractérisation des ARN.*

L'analyse des diverses fractions obtenues (soit ARN total, soit fraction ribosomiale ou soluble) est effectuée par centrifugation en gradient de concentration de saccharose ou par chromatographie sur colonne d'albumine méthylée.

a) *Centrifugation en gradient de concentration de saccharose :*

Ce sont des gradients linéaires de 5 p. 100 à 20 p. 100 de saccharose dissous dans du tampon acétate pH 5,0, NaCl 0,1 M. Le volume total du gradient est de 20 ml

Les fractions à étudier sont déposées, sous un volume de 2 ml, à la surface du gradient. La centrifugation est effectuée pendant une durée de 15 heures à 25.000 t/min et à une température de 4°C.

L'analyse du gradient consiste en un percement du fond du tube à centrifuger et en la récolte, dans des tubes à hémolyse, de fractions alternativement de 3 et 12 gouttes. Les fractions de 3 gouttes sont destinées, après addition de 0,7 ml d'eau distillée, à la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 260 mμ. Les fractions de 12 gouttes sont additionnées d'une goutte d'albumine (« fraction V powder », N.B.C.) à 1 p. 100 puis d'un volume égal de TCA à 10 p. 100. Après précipitation, chaque fraction est filtrée sur membrane filtrante MF 50. Après lavage par du TCA à 5 p. 100 et séchage, les membranes sont soumises à un comptage de radioactivité au moyen d'un compteur proportionnel à circulation de méthane (rendement : 54 p. 100).

b) *Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée :*

Les ARN sont séparés sur colonne d'albumine méthylée, préparée selon Mandell et Hershey [22], au moyen de gradients de NaCl dissous dans du tampon phosphate pH 7,1. Les gradients employés sont soit exponentiels soit composites et ils sont préparés au moyen d'un Varigrad (Technicon).

Les fractions recueillies (2,5 ml) sont mesurées au spectrophotomètre à 260 mμ ; une mesure de la radioactivité est ensuite effectuée sur une partie aliquote (0,5 ml) de chaque fraction, en utilisant la même technique que pour les gradients.

c) *Traitement par la ribonucléase et la désoxy-ribonucléase :*

α) — *Ribonucléase.*

Des traitements par la ribonucléase ont été effectués sur des parties aliquotes des fractions obtenues lors des chromatographies sur colonne d'albumine méthylée.

A 0,5 ml de chaque fraction est ajouté 0,5 ml d'une solution de ribonucléase à 4 μg/ml dans du tampon acétate pH 5,0 (concentration finale en ribonucléase : 2 μg/ml). L'action de la ribonucléase est poursuivie pendant une durée de 1 h 30 à une température de 37°C. La réaction est arrêtée par addition d'une goutte d'albumine à 1 p. 100 et de 1 ml de TCA à 10 p. 100. Le précipité est filtré sur membrane filtrante et la radioactivité mesurée suivant la technique précédemment décrite.

β) — *Désoxy-ribonucléase.*

L'action de la désoxy-ribonucléase a été exercée sur la fraction soluble provenant de l'ARN total extrait de segments de coléoptiles d'Avoine.

A 1,5 ml de la fraction soluble sont ajoutés 0,075 ml de désoxy-ribonucléase à 2 mg/ml et du $MgCl_2$ (concentration finale : 1.10^{-3} M). L'hydrolyse est poursuivie pendant une durée de 15 minutes à 4°C. La désoxy-ribonucléase est ensuite extraite par un traitement au phénol et la phase aqueuse est soumise à trois précipitations par l'éthanol absolu pour récupérer l'ARN.

Résultats.

Etude de la néoformation des divers ARN par sédimentation en gradient de densité.

Chez *Escherichia coli,* Gros et ses collaborateurs [12] ont pu mettre en évidence l'ARN messager en tenant compte des vitesses de synthèse différentes des divers ARN. Une incubation de courte durée en présence d'une forte activité spécifique du précurseur a permis de rendre apparent l'ARN messager dont la proportion est trop faible pour qu'il soit mis en évidence par les mesures de densité optique.

Si le comportement des cellules de coléoptiles d'Avoine devait s'avérer comparable à celui des bactéries, la différenciation des divers types d'ARN pourrait être réalisée par des incubations, en présence du précurseur, de durées différentes. Cependant, le fait que dans un cas il se produise une multiplication cellulaire rapide et dans l'autre cas une élongation comparativement plus lente, laisse prévoir quelques différences. C'est pourquoi une étude préalable de la néoformation des divers ARN présents dans les segments de coléoptiles d'Avoine nous a semblé indispensable.

Cette étude a consisté en l'incubation de segments de coléoptiles d'Avoine en présence de $H_3{}^{32}PO_4$ à 0,3 mC/ml, pendant les durées comprises entre 10 minutes et 5 heures, et en la séparation de l'ARN extrait par centrifugation en gradient de concentration de saccharose. Cependant, l'obtention forfuite, dont il a été question lors de l'exposé des techniques, d'une précipitation sélective de l'ARN ribosomial, a permis de mettre en évidence (après centrifugation en gradient de concentration de la fraction soluble résiduelle) toute une série de pics différents des ARN ribosomial et soluble. Ces pics peuvent être individualisés par des mesures de densité optique et de radioactivité (cf. la figure 4 a, b, c) et ils posent le problème de l'existence d'une troisième fraction. Cette éventualité nous a conduit à doubler la première étude (réalisée sur l'ARN total) par une seconde caractérisée par la séparation systématique de l'ARN total en fractions ribosomiale et soluble qui sont soumises, indépendamment, à une sédimentation en gradient de densité.

1°) *ARN total.*

Les mesures de densité optique mettent en évidence les deux types classiques d'ARN (figure 1) :

— l'ARN ribosomial avec ses deux constituants, dont les positions analogues à celles généralement déterminées pour les ARN végétaux, permettent de leur attribuer des constantes de sédimentation voisines de 23 et 16 S ;

— l'ARN soluble dont la constante de sédimentation est vraisemblablement de 4 S.

L'évolution de l'incorporation du précurseur appelle quelques remarques. Dans le cas de l'ARN ribosomial, le profil de radioactivité, stable

pendant les 20 premières minutes, ne commence à évoluer qu'à partir de la quarantième minute d'incubation. La concordance entre les tracés des courbes de radioactivité et de densité optique n'apparaît qu'après une durée d'incorporation de 80 minutes. L'ARN soluble est caractérisé par une concordance immédiate entre les profils de densité optique et de radioactivité. En outre, le taux d'incorporation semble supérieur, pendant les 40 premières minutes d'incubation, à celui de l'ARN ribosomial.

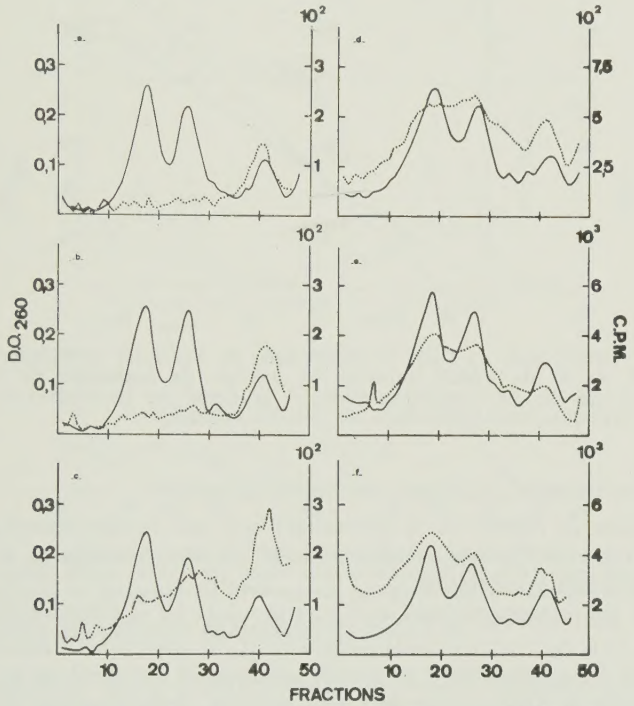

FIG. 1. — Evolution de l'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN de segments de coléoptiles d'Avoine. Les segments ont été incubés pendant des durées de 10 (a), 20 (b), 40 (c), 80 minutes (d), 3 (e) et 5 heures (f) et leur ARN séparé par centrifugation en gradient de concentration. Les courbes en trait continu représentent les mesures de densité optique à 260 mμ et celles en pointillé les mesures de radioactivité.

Le tracé des courbes de radioactivité spécifique de chaque type d'ARN, en fonction de la durée d'incubation, conduit aux graphiques de la figure 2. Le calcul des radioactivités spécifiques, exprimées en c.p.m./unité de densité optique, a été réalisé à partir des fractions 10 à 32 dans le cas de l'ARN ribosomial et 36 à 44 dans le cas de l'ARN soluble (exemples de la figure 1 a). Les valeurs qui ont servi au tracé des courbes de la figure 2 sont la moyenne de deux expériences indépendantes. Ces courbes font apparaître une phase de latence dans l'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$,

d'une durée voisine de 40 minutes. Elle est cependant beaucoup plus nette dans le cas de l'ARN ribosomial, où elle correspond aux nombreux pics de radioactivité (cf. figure 1 a, b, c). Ces courbes confirment d'autre part que le taux d'incorporation du précurseur dans l'ARN soluble est initialement plus élevé que celui dans l'ARN ribosomial.

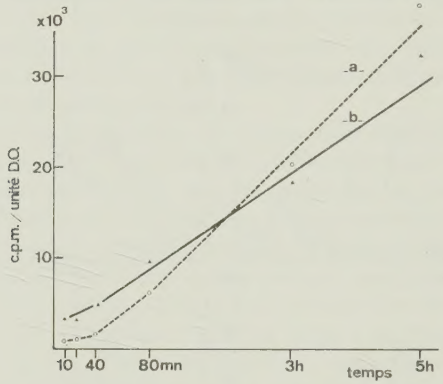

FIG. 2. — Evolution, en fonction du temps, de l'activité spécifique de l'ARN ribosomial (a) et de l'ARN soluble (b) extrait de segments de coléoptiles d'Avoine et séparés par centrifugation en gradient de concentration. Activité spécifique exprimée en c.p.m./unité de densité optique.

2°) *Séparation en fractions ribosomiale et soluble.*

Cette étude ne diffère de la précédente que par la séparation préalable de l'ARN total en fractions ribosomiale et soluble. Les figures 3 et 4 présentent les résultats obtenus.

Ceux-ci sont analogues aux précédents mais la fraction soluble comprend, en plus de l'ARN soluble proprement dit, une zone d'aspect hétérogène située à l'emplacement de l'ARN ribosomial. Le symbole S_x lui a été attribué pour la différencier de l'ARN soluble. Cette fraction S_x présente de nombreux pics de radioactivité dont la concordance avec ceux mis en évidence par les mesures de densité optique est faible. Leur distribution et leur intensité relative ne commencent vraiment à se modifier que si la durée du temps d'incubation est supérieure à 80 minutes. Mais l'évolution ultérieure montre que cette fraction présente une véritable incorporation métabolique et qu'elle constitue donc bien une entité distincte des deux ARN. Une expérience complémentaire a été réalisée pour déterminer la nature de cette fraction S_x. La fraction soluble de l'ARN total, extrait de segments de coléoptiles mis à incuber pendant une durée de 3 heures dans une solution de $H_3{}^{32}PO_4$ à 0,3 mC/ml, a été scindée en deux parties dont l'une a été soumise à l'action de la désoxy-ribonucléase. Le calcul des activités spécifiques des fractions S_x et de l'ARN soluble, après leur séparation par centrifugation en gradient de concentration de saccharose, four-

nit les valeurs qui sont rassemblées dans le Tableau I. Elles permettent d'avancer que la fraction S_x est constituée en partie par de l'ADN. Il faut cependant remarquer que l'activité spécifique de l'ARN soluble a égale-

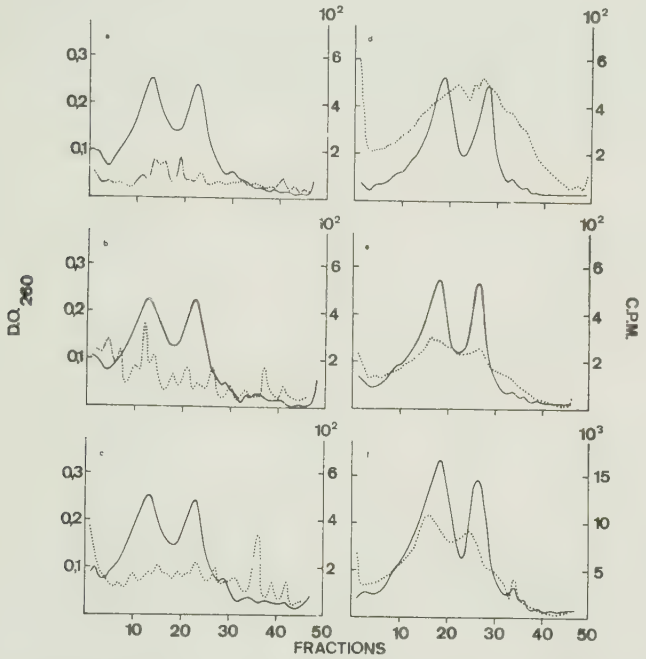

FIG. 3. — Incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans la fraction ribosomiale obtenue à partir de l'ARN total extrait de segments de coléoptiles d'Avoine. Les segments ont été incubés, en présence de précurseur, pendant des durées de 10 (a), 20 (b), 40 (c), 80 minutes (d), 3 (e) et 5 heures (f). La fraction ribosomiale est constituée par l'ARN qui précipite en présence de NaCl I M.

ment diminué. Or CLICK et HACKETT [8] ont mis en évidence qu'un traitement par la désoxy-ribonucléase d'ARN extrait de Pois, entraîne une augmentation de la surface correspondant à l'ARN 4 S ; cette augmentation

TABLEAU I.

Activité spécifique (exprimée en c.p.m./unité de densité optique) de l'ARN soluble et de la fraction S_x, extraits de segments de coléoptiles d'Avoine mis à incuber pendant 3 heures dans du $H_3{}^{32}PO_4$ à 0,3 mC/ml, avant et après traitement par la désoxy-ribonucléase.

	Témoin	Traitement par la DNase
ARN soluble	27 500	19 500
Fraction S_x	41 300	17 600

serait due aux produits d'hydrolyse de l'ADN. Cette observation permet donc de rendre compte de la diminution de l'activité spécifique de l'ARN soluble.

Comme précédemment, les calculs des radioactivités spécifiques ont été réalisés, mais à partir des fractions 6 à 29 dans le cas de l'ARN ribosomial (exemple de la figure 3 a), 8 à 35 dans le cas de la fraction S_x et 36 à 44 dans le cas de l'ARN soluble (exemples de la figure 4 a). Les courbes de radioactivité spécifique (figure 5) indiquent que l'incorporation initiale est moins rapide avec cette population de segments de coléoptiles qu'avec

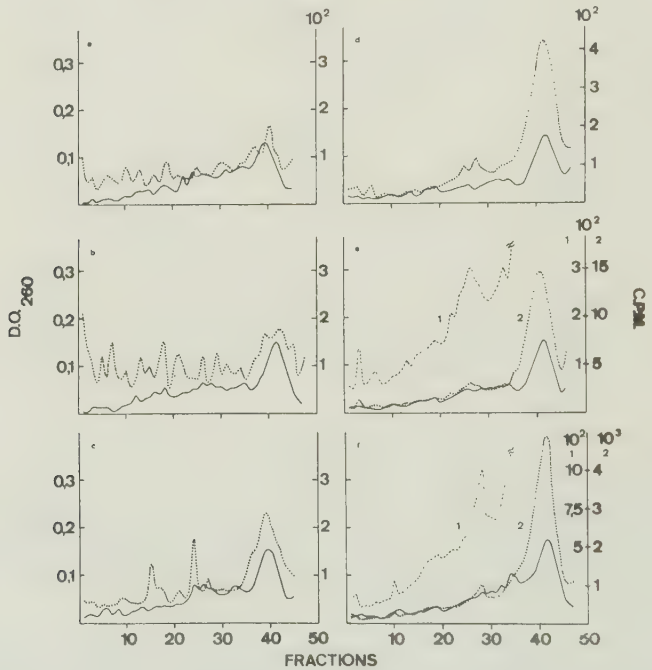

Fig. 4. — Incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans la fraction soluble obtenue à partir de l'ARN total extrait de segments de coléoptiles d'Avoine. Les segments ont été incubés, en présence de précurseur pendant des durées de 10 (a), 20 (b), 40 (c), 80 minutes (d), 3 (e) et 5 heures (f). La fraction soluble est constituée par les composés solubles dans le NaCl I M.

la précédente, ce qui est surtout visible dans le cas de l'ARN soluble. Malgré ce fait, l'évolution générale est analogue à la précédente. Il faut cependant noter que la différence entre les courbes des activités spécifiques des ARN ribosomial et soluble est beaucoup plus importante que lors de la première étude. Cet écart est dû à la présence, lors de la centrifugation de l'ARN total, de la fraction S_x, comme le démontre la courbe a' de la figure 5. Cette courbe est en effet la moyenne des activités spécifiques de l'ARN ribosomial et de la fraction S_x qui lui correspond. L'ir-

corporation du précurseur dans cette fraction S_x étant plus lente que celle des autres constituants de l'extrait, sa présence a pour effet de diminuer l'activité spécifique de l'ARN ribosomial.

L'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN de segments de coléoptiles d'Avoine est donc caractérisée par l'existence de deux phases dont la première (d'une durée approximative de 40 minutes) ne semble pas correspondre à des processus véritablement métaboliques.

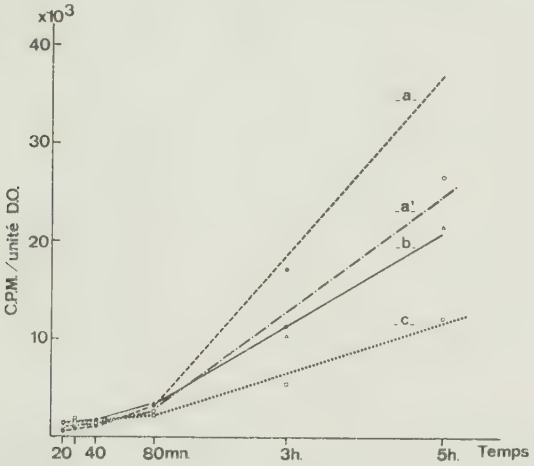

FIG. 5. — Evolution, en fonction du temps, de l'activité spécifique des ARN extraits de segments de coléoptiles d'Avoine.

a) : ARN ribosomial.
b) : ARN soluble.
c) : fraction S_x.
a') : moyenne de l'activité spécifique de l'ARN ribosomial et de celle de la fraction S_x.

Caractérisation de l'ARN impliqué dans l'action de l'auxine.

Les résultats de l'étude de la néoformation des ARN indiquent qu'une incorporation du précurseur d'une durée de 60 minutes serait susceptible de fournir le maximum d'informations sur la nature de l'ARN impliqué dans l'action de l'auxine. Cependant, il n'y avait aucune raison de considérer « a priori » qu'une durée d'incorporation inférieure ne donnerait pas des résultats intéressants. C'est pourquoi deux durées d'incorporation du précurseur ont été choisies : 10 et 60 minutes.

1°) *Durée d'incorporation de 10 minutes.*

L'expérimentation a consisté en une étude de l'influence de l'auxine sur le taux d'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$. Le protocole expérimental suivant a été adopté : les segments sont pré-incubés en absence ou en présence d'AIA (aux concentrations de $5{,}7.10^{-5}$ M et $2{,}85.10^{-3}$ M) pendant des durées comprises entre 30 minutes et 5 heures, puis transférés pendant une durée

de 10 minutes dans des solutions identiques mais contenant en outre 0,9 mC/ml de $H_3{}^{32}PO_4$. Après extraction, les ARN totaux sont soumis à une centrifugation en gradient de concentration.

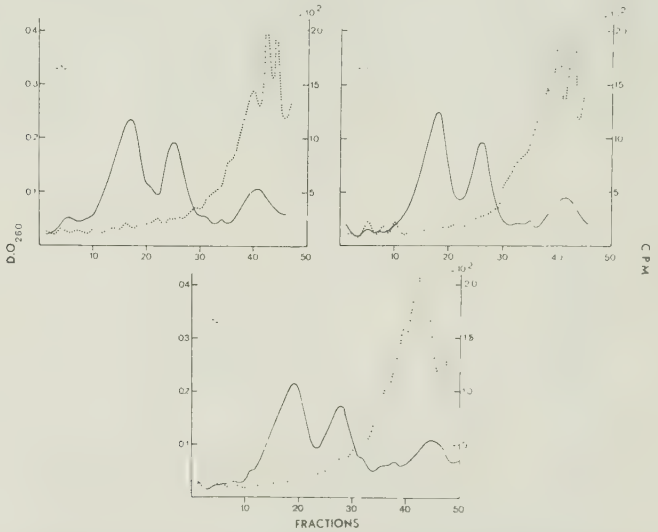

Fig. 6. — Influence de l'AIA sur l'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN de segments de coléoptiles d'Avoine. Les segments, après une incubation de 2 heures dans du tampon (a) ou de l'auxine à $5{,}7.10^{-5}$ M (b) et à $2{,}85.10^{-3}$ M (c), sont mis à incuber pendant 10 minutes dans des solutions de mêmes compositions mais contenant en outre 0,9 mC/ml de $H_3{}^{32}PO_4$. Séparation de l'ARN total par centrifugation en gradient de concentration.

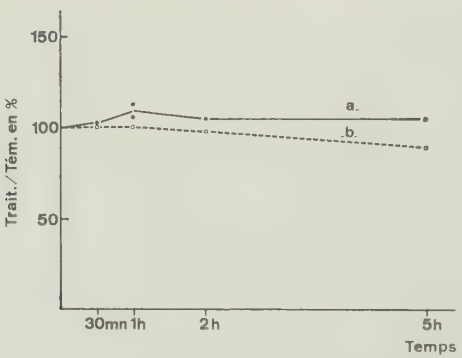

Fig. 7. — Influence de l'auxine sur le taux d'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN ribosomial de segments de coléoptiles d'Avoine.

Après une incubation de 30 minutes à 5 heures dans des solutions d'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M (a) et à $2{,}85.10^{-3}$ M (b), les segments sont transférés, pendant une durée de 10 minutes dans le précurseur radioactif. Les courbes représentent l'évolution des rapports des activités spécifiques (exprimées en c.p.m./unité de densité optique) de l'ARN extrait de segments traités par l'AIA à celles de l'ARN extrait de segments témoins.

Les profils de radioactivité obtenus montrent peu de phénomènes intéressants, si ce n'est l'apparition d'une hétérogénéité au niveau de l'ARN soluble ; la figure 6 est fournie à titre d'exemple.

Le calcul des activités spécifiques de chaque type d'ARN (ribosomial et soluble) ainsi que celui des rapports des activités spécifiques de chaque ARN extrait de segments traités à celles de l'ARN extrait de segments témoins sont présentés sous forme de courbes dans les figures 7 et 8. Il en ressort que seule la concentration en AIA de $2{,}85.10^{-3}$ M exerce une faible action inhibitrice sur le taux d'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans les ARN ; cette action est légèrement plus accentuée dans le cas de l'ARN ribosomial.

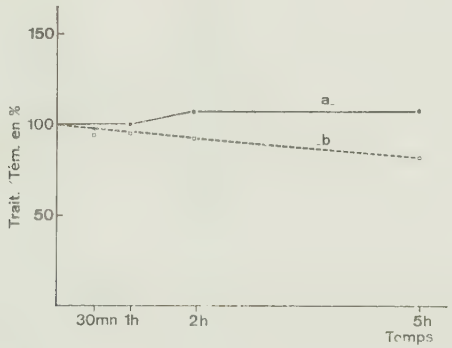

FIG. 8. — Influence de l'auxine sur le taux d'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN soluble de segments de coléoptiles d'Avoine.

Après une incubation de 30 minutes à 5 heures dans des solutions d'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M (a) et à $2{,}85.10^{-3}$ M (b), les segments ont été transférés pendant une durée de 10 minutes dans le précurseur radioactif. Les courbes représentent l'évolution du rapport des activités spécifiques (exprimées en c.p.m./unité de densité optique) de l'ARN extrait de segments traités par l'AIA à celles de l'ARN extrait de segments témoins.

2°) *Durée d'incorporation de 60 minutes.*

Les segments de coléoptiles sont mis à pré-incuber dans du tampon en absence ou en présence d'AIA (aux concentrations de $5{,}7.10^{-5}$ M et $2{,}85.10^{-3}$ M) pendant des durées de 0, 1, 4 et 9 heures puis transférés dans la solution de $H_3{}^{32}PO_4$ à 0,3 mC/ml, pendant une durée de 60 minutes. Après extraction et séparation de l'ARN en fractions ribosomiale et soluble, celles-ci sont soumises à une centrifugation en gradient de concentration.

Les figures 9 à 12 présentent les résultats obtenus. Leur examen permet de se rendre compte de l'existence :

— d'une stimulation de l'incorporation du précurseur dans l'ARN soluble sous l'influence de l'AIA. Cette stimulation est particulièrement visible après une durée de traitement de 1 heure ;

— d'une inhibition de cette incorporation dans l'ARN ribosomial lorsque l'AIA est à la concentration de $2{,}85.10^{-3}$ M.

L'auxine ne semble pas avoir d'effet sur l'incorporation du précurseur dans la fraction S_x.

Comme précédemment, les calculs des radioactivités spécifiques ont été effectués. Le tracé des courbes des rapports des activités spécifiques de l'ARN extrait des segments traités par l'AIA à celles de l'ARN extrait des segments témoins conduit aux figures 13 et 14. Envisageons tout d'abord l'ARN ribosomial (figure 13) : l'auxine, à la concentration optimale, n'a

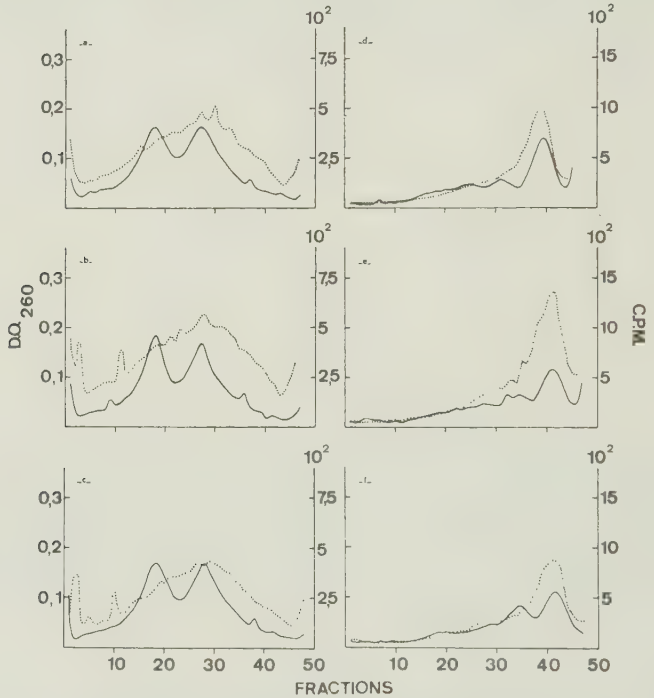

Fig. 9. — Influence de l'auxine sur l'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN de segments de coléoptiles d'Avoine.

Les segments ont été incubés pendant 60 minutes dans du tampon (a, d) ou de l'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M (b, e) et à $2{,}85.10^{-3}$ M (c, f), en présence de 0,3 mC/ml de $H_3{}^{32}PO_4$. Après extraction, l'ARN total a été scindé en fractions ribosomiale (a, b, c) et soluble (d, e, f) par l'emploi de NaCl I M. Chaque fraction a été soumise à une centrifugation en gradient de concentration.

que très peu ou pas d'effet sur le taux d'incorporation. Il se produit par contre une inhibition très rapide de l'incorporation lorsque la concentration est de $2{,}85.10^{-3}$ M. Il faut noter à ce dernier sujet une variabilité assez grande qui se manifeste pendant les deux premières heures du traitement. Une illustration en est fournie dans les figures 9 et 10 ; les tracés qui y figurent ont été délibérément choisis pour la mettre en évidence.

En ce qui concerne l'ARN soluble (figure 14), l'action de l'auxine se caractérise par une stimulation transitoire du taux d'incorporation du

précurseur. Elle est maximale pour une durée de pré-incubation de 1 heure. Elle est suivie par une chute jusqu'à une valeur très légèrement supérieure à celle des segments témoins (concentration en AIA de $5{,}7.10^{-5}$ M) ou par une inhibition lorsque la concentration en AIA est de $2{,}85.10^{-3}$ M. L'amplitude moins élevée de la stimulation du taux d'incorporation du précurseur dans l'ARN soluble, obtenue lorsque la concentration en AIA est supra-optimale, est probablement due au début au ralentissement de ce taux qui se manifeste ultérieurement.

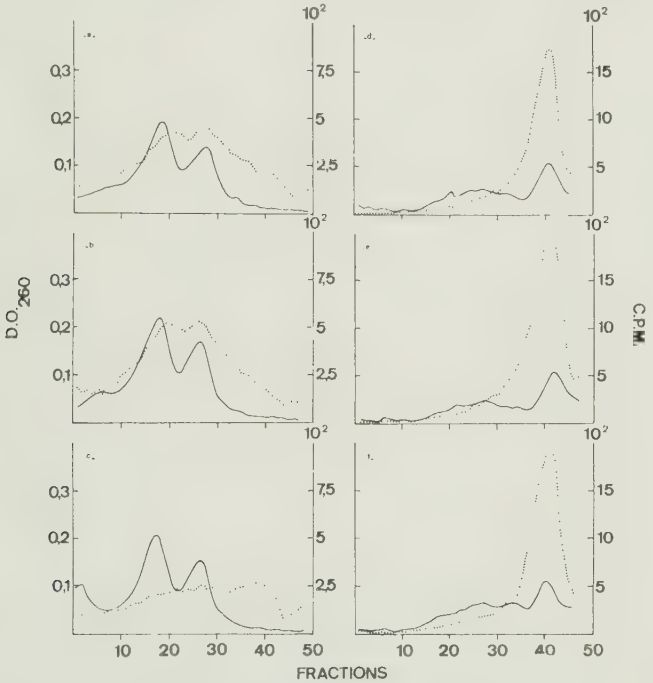

FIG. 10. — Influence de l'auxine sur l'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN de segments de coléoptiles d'Avoine.

Les segments, après une pré-incubation de 60 minutes dans du tampon (a, d) ou de l'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M (b, e) et à $2{,}85.10^{-3}$ M (c, f) ont été transférés pendant 60 minutes dans des solutions de même composition contenant, en outre, 0,3 mC/ml du précurseur. Après extraction, l'ARN total a été scindé en fractions ribosomiale (a, b, c) et soluble (d, e, f) par l'emploi de NaCl I M et chaque fraction a été soumise à une centrifugation en gradient de concentration.

La rapidité de l'incorporation du précurseur dans l'ARN soluble est assez surprenante. Serait-il possible qu'il existe dans cette fraction un ARN à marquage rapide qui pourrait être instable et différent de l'ARN de transfert ? Cette instabilité pourrait expliquer le ralentissement du taux d'incorporation. Un traitement par l'actinomycine D montre (figure 15) que l'ARN soluble contient un ou plusieurs constituants dont la synthèse

est rapidement inhibée par ce composé. Il se pourrait donc que l'effet induit par l'auxine sur l'ARN soluble soit dû à un ARN différent de l'ARN de transfert.

Cet ARN pourrait être, par exemple, l'ARN de faible poids moléculaire lié aux ribosomes et dont l'existence a été récemment montrée. Cet ARN est en effet connu chez les bactéries [30, 31] et les cellules animales [11, 38]. Comme cet ARN n'est pas dissociable de l'ARN soluble par la technique de sédimentation en gradient de concentration, il convenait de vérifier sa présence par l'emploi d'une autre technique, la chromatographie sur colonne d'albumine méthylée.

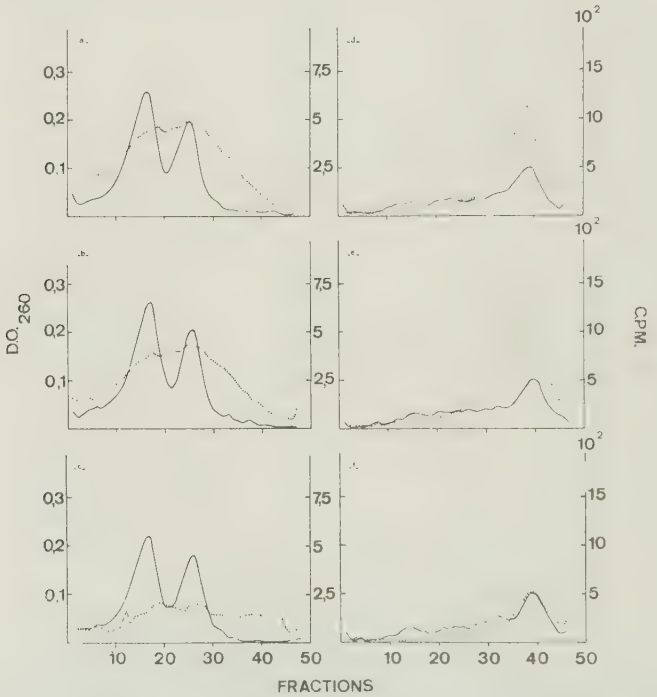

Fig. 11. — Influence de l'auxine sur l'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN de segments de coléoptiles d'Avoine.

Les segments, après une pré-incubation de 4 heures dans du tampon (a, d) ou de l'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M (b, e) et à $2{,}85.10^{-3}$ M (c, f), ont été transférés pendant 60 minutes dans des solutions de même composition mais contenant en outre 0,3 mC/ml du précurseur. Après extraction, l'ARN total a été scindé en fractions ribosomiale (a, b, c) et soluble (d, e, f) par l'emploi de NaCl I M. Chaque fraction a été soumise à une centrifugation en gradient de concentration.

Nature de l'effet stimulateur de l'auxine sur l'ARN soluble.

1°) *Chromatographie de la fraction soluble sur colonne d'albumine méthylée.*

Les segments de coléoptiles ont été mis à incuber pendant une durée de deux heures dans un milieu tamponné contenant 0,3 mC/ml de $H_3{}^{32}PO_4$

et avec ou sans addition d'AIA à la concentration de $5{,}7.10^{-5}$ M. Après extraction de l'ARN et individualisation des fractions ribosomiale et soluble, cette dernière est chromatographiée sur colonne d'albumine méthylée. Les éluats recueillis (2,5 ml) servent à la mesure de la densité optique à 260 mμ, de la radioactivité totale (sur 0,5 ml), de la radioactivité résistante à la ribonucléase (sur 0,5 ml) et au dosage de l'ADN par la méthode de Burton [3] sur 1 ml.

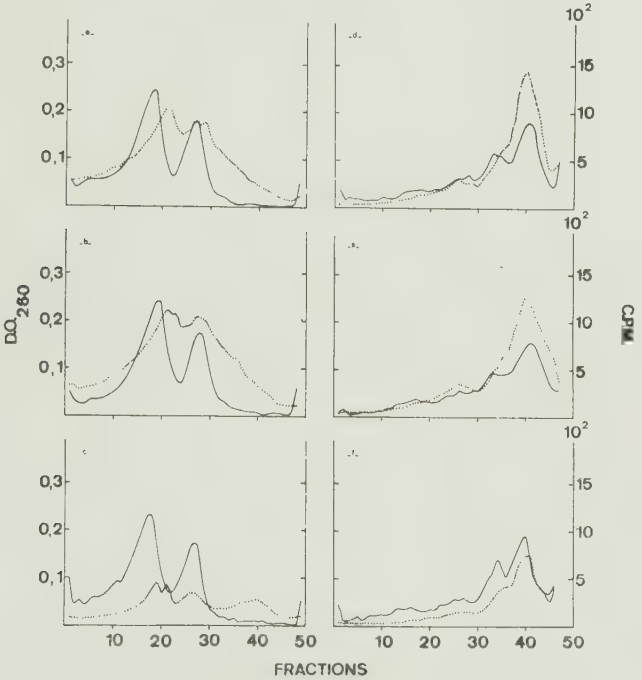

Fig. 12. — Influence de l'auxine sur l'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN de segments de coléoptiles d'Avoine.

Les segments, après une pré-incubation de 9 heures dans du tampon (a, d) ou de l'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M (b, e) et à $2{,}85.10^{-3}$ M (c, f), ont été transférés pendant une durée de 60 minutes dans des solutions de même composition mais contenant en outre 0,3 mC/ml du précurseur. Après extraction, l'ARN total a été scindé en fractions ribosomiale (a, b, c) et soluble (d, e, f) par l'emploi de NaCl I M. Chaque fraction a été soumise à une centrifugation en gradient de concentration.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 16. La radioactivité correspond bien à l'ARN soluble malgré la présence d'un ARN étranger qui pourrait être l'ARN 5 S. La contamination par cet ARN (situé, par exemple dans la figure 16 a, à partir de la fraction 20) est cependant faible comme le montre la surface relative occupée par ces deux types d'ARN.

Ces chromatographies appellent quelques remarques supplémentaires. Elles confirment les conclusions tirées du Tableau I : la fraction soluble contient bien de l'ADN. D'autre part, cet ADN est le siège d'une certaine

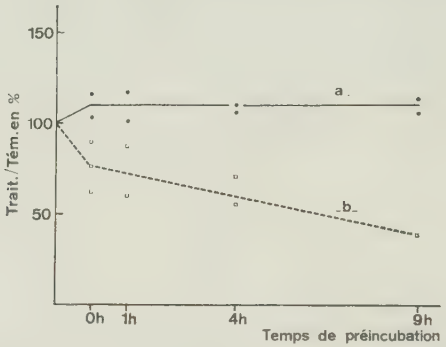

FIG. 13. — Influence de l'auxine sur le taux d'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN ribosomial de segments de coléoptiles d'Avoine.

Après une pré-incubation de 0 à 9 heures dans des solutions d'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M (a) et à $2{,}85.10^{-3}$ M (b), les segments ont été transférés pendant une durée de 60 minutes dans le précurseur radioactif. Les courbes représentent l'évolution des rapports des activités spécifiques (exprimées en c.p.m./unité de densité optique) de l'ARN extrait de segments traités par l'AIA à celles de l'ARN extrait de segments témoins.

incorporation de précurseur radioactif, comme le démontrent les courbes de la radioactivité résistante à la ribonucléase, qui épousent les profils des courbes de dosage colorimétrique. De plus, cet ADN n'est pas homogène ; il peut être scindé en deux fractions en modifiant la composition

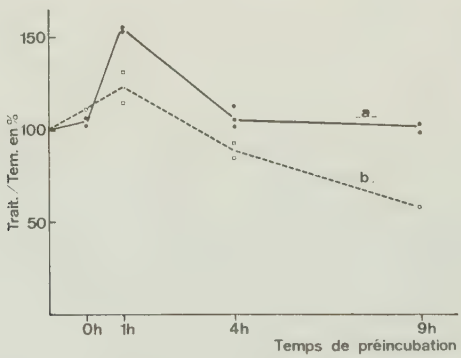

FIG. 14. — Influence de l'auxine sur le taux d'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN soluble de segments de coléoptiles d'Avoine.

Après une pré-incubation de 0 à 9 heures dans des solutions d'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M (a) et à $2{,}85.10^{-3}$ M (b), les segments ont été transférés, pendant une durée de 60 minutes dans le précurseur radioactif. Les courbes représentent l'évolution des rapports des activités spécifiques (exprimées en c.p.m./unité de densité optique) de l'ARN extrait de segments traités par l'AIA à celles de l'ARN extrait de segments témoins.

du gradient d'élution (cf. la figure 16 a et b). Enfin, il est probable que cet ADN est mélangé à de l'ARN ; l'existence d'une radioactivité sensible à la ribonucléase, à son niveau, le démontre. Mais il n'est pas possible d'affirmer, à la suite de cette simple conjonction de présence, que ces deux composés sont sous forme de complexe.

Cependant, afin de s'assurer que cet ARN soluble était bien homogène, les reliquats des éluats correspondant (fractions 10 à 23 dans le cas de l'ARN des segments témoins et 4 à 12 dans celui de l'ARN des segments traités) ont été rassemblés puis l'ARN précipité et, après dissolution, soumis à une nouvelle chromatographie sur colonne d'albumine méthylée en

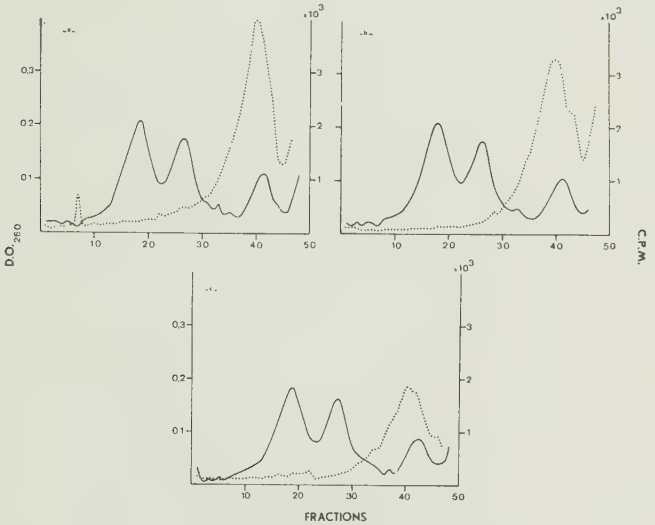

Fig. 15. — Influence de l'actinomycine D à 2,4.10^{-5} M sur l'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN de segments de coléoptiles d'Avoine.

Les segments ont été préincubés pendant 30 minutes (a), 1 heure (b) et 2 heures (c) dans une solution d'actinomycine D, puis transférés pendant une durée de 10 minutes, dans le même milieu contenant, en outre, 0,9 mC/ml de $H_3{}^{32}PO_4$. L'ARN total extrait a été ensuite soumis à une centrifugation en gradient de concentration.

utilisant des gradients de pente moins accentuée. Les résultats de cette nouvelle chromatographie montrent (figure 17) que la radioactivité correspond toujours à l'ARN soluble et qu'elle est très nettement supérieure lorsque les segments ont été traités par de l'auxine.

2°) *Analyse de la répartition de la radioactivité dans les nucléotides de l'ARN soluble.*

La stimulation de l'incorporation du précuseur radioactif dans l'ARN soluble peut être due soit à une accélération du renouvellement du triplet terminal de cet ARN soit à une véritable synthèse. L'analyse de la répartition de la radioactivité permettra de savoir laquelle de ces éventualités

est correcte. En effet, une augmentation de la radioactivité répartie essentiellement dans les acides cytidylique et adénylique signifierait que la première hypothèse est correcte. Par contre, une augmentation de la radioactivité également répartie dans les quatre nucléotides permettrait de conclure à une stimulation de la synthèse de l'ARN.

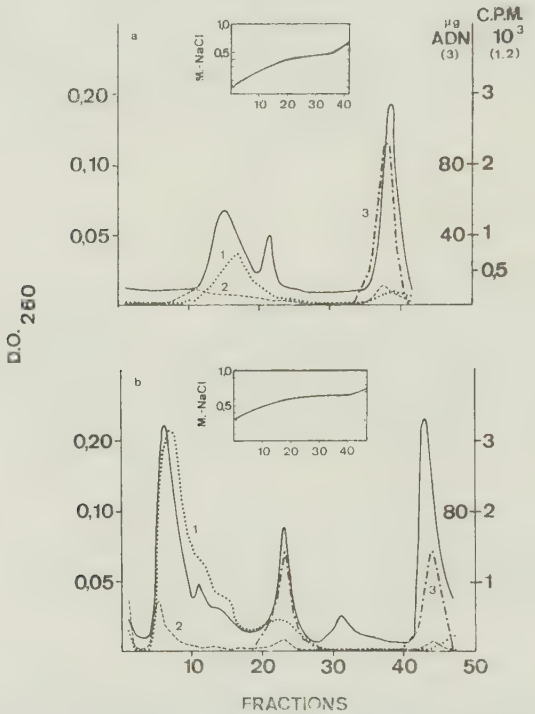

Fig. 16. — Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée de la fraction soluble obtenue (par l'emploi de NaCl I M) à partir de l'ARN total extrait de segments de coléoptiles d'Avoine.

Les segments ont été mis à incuber, pendant une durée de 2 heures, dans du $H_3{}^{32}PO_4$ plus du tampon (a) ou de l'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M (b). Les courbes en trait continu représentent les mesures de densité optique ; les courbes 1 et 2 représentent respectivement la radioactivité sensible et résistante à la ribonucléase et la courbe 3 les quantités d'ADN mesurées par colorimétrie (méthode de Burton).

L'encadré représente le gradient de Na Cl utilisé pour la séparation des divers constituants de la fraction soluble.

Mais avant d'aborder l'étude de la répartition de la radioactivité dans les divers nucléotides, il nous a paru opportun de déterminer la composition de l'ARN soluble.

a) *Composition de l'ARN soluble.*

La composition nucléotidique de l'ARN soluble a été déterminée sur ARN isolé de la fraction soluble après sédimentation en gradient de con-

centration. Après hydrolyse de cet ARN de la potasse 0,3 N à 37°C pendant une durée de 18 heures, les nucléotides sont séparés par chromatographie sur colonne de Dowex I (forme formiate) au moyen d'un gradient de 0 à 4 M en acide formique.

La composition de l'ARN soluble est fournie dans le Tableau II, où figurent également, à titre de comparaison, celles de l'ARN ribosomial et de l'ARN présent dans la fraction S_x.

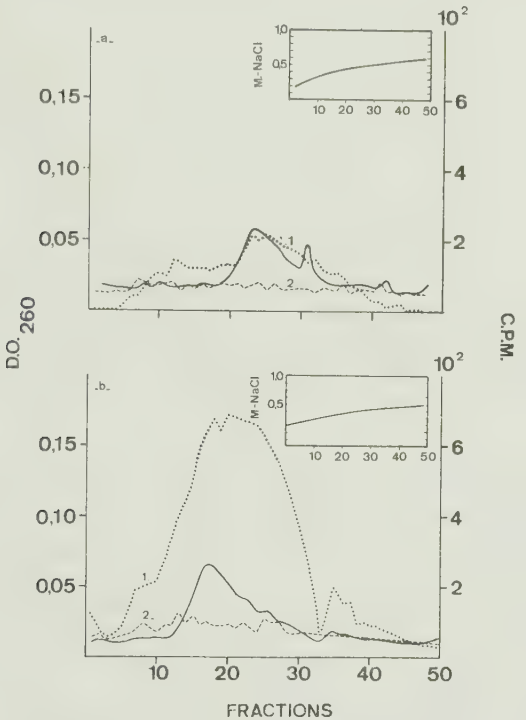

Fig. 17. — Rechromatographie sur colonne d'albumine méthylée de l'ARN soluble séparé lors de la chromatographie précédente (figure 16).

Les fractions 10 à 23 (figure 16a : ARN de segments témoins) et 3 à 11 (figure 16b : segments traités par l'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M) ont été utilisées pour cette deuxième chromatographie.

Les courbes en trait continu représentent les mesures de densité optique ; les courbes 1 et 2 représentent respectivement la radioactivité sensible et résistante à la ribonucléase.

La composition de l'ARN soluble, extrait de segments de coléoptiles d'Avoine, est semblable à celle de l'ARN extrait de matériels différents [6, 8]. De même, celle de l'ARN ribosomial est analogue à celle déterminée par Hamilton et ses collaborateurs [13] ainsi que par Tester et Dure [35] dans le cas de segments de coléoptiles d'Avoine. L'ARN de la fraction S_x

présente la particularité d'une forte teneur en AMP par rapport à celle en GMP. Cette composition est proche de celle de l'ARN appelé « D-RNA » par Ingle, Key et Holm [15], et qui serait l'ARN messager.

Tableau II.

Composition des ARN soluble, ribosomial et de la fraction S_x extraits de segments de coléoptiles d'Avoine.

Les proportions de chaque nucléotide, calculées à partir des mesures de densité optique, sont exprimées en pour cent.

ARN	Nucléotides					
	CMP	AMP	GMP	UMP	$\frac{GMP}{AMP}$	$\frac{AMP + UMP}{CMP + GMP}$
Soluble.....	27,7	20,1	31,1	21,1	1,54	0,68
Ribosomial.....	22,6	23,4	31,9	22,1	1,36	0,83
S_x	23,8	28,8	19,4	28,0	0,67	1,31

b) *Analyse de la répartition de la radioactivité.*

Pour cette étude, l'expérimentation suivante a été réalisée : les segments de coléoptiles d'Avoine ont été incubés d'une part dans du $H_3{}^{32}PO_4$ à 0,3 mC/ml pendant une durée de 30 minutes, en absence ou en présence

Tableau III.

Analyse de la répartition de la radioactivité dans les nucléotides de l'ARN soluble de segments de coléoptiles d'Avoine.

Les segments ont été mis à incuber pendant 30 minutes dans une solution de $H_3{}^{32}PO_4$ à 0,3 mC/ml, en absence ou en présence d'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M.

Traitement		CMP	AMP	GMP	UMP
Témoin	cpm	375	300	1 225	400
	D.O.	0,445	0,370	0,528	0,340
	cpm/D.O.	845	815	2 320	1 180
AIA $5{,}7.10^{-5}$ M	cpm	455	315	1 475	550
	D.O.	0,405	0,338	0,472	0,345
	cpm/D.O.	1 120	930	3 120	1 580
$\frac{\text{AIA } 5{,}7.10^{-5} \text{ M}}{\text{Témoin}}$	en p.100	148	115	135	134

d'AIA à la concentration de $5{,}7.10^{-5}$ M, et d'autre part pendant une durée de 60 minutes dans le précurseur après une incubation préalable d'une durée de 1 heure en absence ou en présence d'AIA.

Les résultats présentés dans les Tableaux III et IV permettent de conclure à une augmentation de la radioactivité également répartie dans les quatre nucléotides.

TABLEAU IV.

Analyse de la répartition de la radioactivité dans les nucléotides de l'ARN soluble de segments de coléoptiles d'Avoine.

Après une pré-incubation de 1 heure en absence ou en présence d'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M, les segments ont été mis à incuber pendant une durée de 60 minutes dans du $H_3{}^{32}PO_4$ à 0,3 mC/ml en absence ou en présence d'AIA à $5{,}7.10^{-5}$ M.

Traitement		CMP	AMP	GMP	UMP
Témoin	cpm	1 873	1 325	4 840	1 925
	D.O.	0,380	0,316	0,460	0,310
	cpm/D.O.	4 925	4 200	10 520	6 210
AIA $5{,}7.10^{-5}$ M	cpm	2 025	1 635	6 300	2 440
	D.O.	0,395	0,335	0,460	0,318
	cpm/D.O.	5 800	4 670	13 700	7 700
AIA $5{,}7.10^{-5}$ M / Témoin	en p. 100	118	112	130	124

Il semble donc que la stimulation de l'incorporation du précurseur dans l'ARN soluble soit le résultat d'une stimulation de la synthèse de cet ARN.

DISCUSSION.

La caractéristique de l'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN de segments de coléoptiles d'Avoine, est l'existence d'une phase de latence. Un comportement analogue existe dans le cas de germinations d'Arachide [6]. Il est intéressant de noter en outre que l'incorporation du ^{32}P dans les phospholipides de tissus de Scorsonère (souche normale, anergiée ou « crown gall ») présente des caractéristiques très voisines : incorporation à un taux faible pendant 30 à 35 minutes puis augmentation prononcée de celui-ci [9].

L'existence de cette phase de latence conduit à penser qu'une véritable incorporation métabolique ne peut se produire immédiatement. Il est probable qu'elle correspond d'une part à la mobilisation des précurseurs endogènes et d'autre part au temps nécessaire pour que les groupements phosphoriques exogènes et ceux du « pool » cellulaire s'équilibrent. Ce dernier devrait donc être assez élevé pour rendre compte de la durée de cette phase de latence. Mais il se pourrait aussi qu'elle représente la période au cours de laquelle le traceur s'incorpore surtout dans l'ARN mes-

sager. Mais cela conduirait à admettre que l'ARN messager se répartit en deux fractions (soluble et non soluble dans le NaCl 1 M), puisque les nombreux pics de radioactivité caractéristiques de cette phase de latence se retrouvent dans les fractions ribosomiale et soluble.

L'étude de la néoformation des ARN a permis de montrer, en outre, la nécessité de séparer, au moyen du NaCl 1 M, la fraction ribosomiale (contenant l'ARN ribosomial et éventuellement l'ARN messager) de la fraction soluble (constituée par l'ARN soluble et d'autres composés dont l'ADN). Cette séparation est indispensable pour obtenir une mesure correcte de l'incorporation du précurseur dans l'ARN ribosomial.

La recherche du type moléculaire d'ARN impliqué dans l'action de l'auxine a été abordé par la mesure de l'influence de l'AIA sur le taux d'incorporation du $H_3{}^{32}PO_4$ dans l'ARN de segments de coléoptiles d'Avoine. Deux durées d'incubation, en présence du précurseur, ont été utilisées : l'une de 10 minutes et l'autre de 60 minutes. Ces deux séries d'expériences montrent l'opposition qui existe entre ces deux durées d'incubation. La première (10 minutes) ne permet pas de se rendre compte d'un effet de l'auxine sur le taux d'incorporation du précurseur dans l'un ou l'autre des ARN. La seconde (60 minutes) démontre clairement que l'auxine induit des changements marqués : il est alors possible de dissocier les effets des deux concentrations utilisées et cette dissociation est particulièrement nette dans le cas de l'ARN ribosomial. D'une part, la concentration optimale en auxine induit une très légère stimulation du taux d'incorporation du précurseur, qui se maintient tout au long du traitement ; elle aboutirait donc, si le traitement avait été continu, à une nette stimulation de la synthèse de l'ARN ribosomial, ce qui a d'ailleurs été observé [13, 35]. D'autre part, l'inhibition provoquée par la concentration supraoptimale est extrêmement prononcée.

Ce comportement est particulièrement intéressant si on le rapproche du fait que les deux concentrations ont, tout au moins pendant les deux premières heures, une action semblable sur le métabolisme de l'ARN soluble. Elle se traduit par une stimulation transitoire de la synthèse de cet ARN, qui est mesurable après une durée du traitement de 30 minutes et qui atteint son amplitude maximale au bout d'une durée de 1 heure.

Ces résultats permettent d'interpréter ceux obtenus dans une étude précédente [10], qui consistait en la mesure de l'influence de l'auxine sur l'incorporation d'uracile dans l'ARN total. La stimulation initiale observée était donc due à une augmentation de l'incorporation de l'uracile dans l'ARN soluble et l'inhibition ultérieure induite par la concentration supraoptimale avait pour origine une diminution de l'incorporation d'uracile dans l'ARN ribosomial puis dans l'ARN soluble. De plus, le ralentissement du taux d'incorporation qui avait été mis en évidence se trouve confirmé. Enfin, l'amplitude de la stimulation de l'incorporation de $H_3{}^{32}PO_4$ qui est légèrement supérieure à 50 p. 100, permet de rendre compte des différences relativement faibles qui étaient mesurables lors de l'incorporation d'uracile.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence une action sur un ARN qui aurait pu être l'ARN messager. En effet, et bien que les profils de radioactivité (obtenus après centrifugation en gradient de concentration de saccharose) semblent indiquer la présence de cet ARN au niveau de l'ARN ribosomial, la technique employée ne donne pas une résolution suffisante pour les individualiser. Cela a donc prévenu toute estimation de leur proportion relative. Cependant, si dans le cas des segments de coléoptiles d'Avoine, la situation est analogue à celle qui existe dans le cas de segments d'hypocotyles de Soja [15], la radioactivité incorporée après une incubation d'une durée de 1 heure devrait être ainsi répartie : 1/3 dans l'ARN ribosomial et 2/3 dans l'ARN messager. Une action de l'auxine sur l'ARN messager devrait dont être mesurable. Un résultat négatif ne peut être dû qu'à une absence d'effet sur l'ARN messager ou bien à une action sur quelques molécules de cet ARN dont la proportion serait trop faible pour permettre la mise en évidence de cette action.

Il convient maintenant d'envisager les conclusions qui peuvent être dégagées en ce qui concerne le mode d'action de l'auxine. L'AIA provoque une stimulation de la synthèse de l'ARN soluble, qui est mesurable après une durée de traitement de 30 minutes et atteint son amplitude maximale après une heure. Il est très important de savoir si cette manifestation de l'action de l'auxine précède celle sur la croissance. D'après les mesures macroscopiques des longueurs de segments de coléoptiles d'Avoine, la stimulation de croissance n'apparaît qu'entre 2 et 3 heures après le transfert dans la solution d'auxine et cela permettrait d'affirmer qu'elle la précède. Or des mesures du taux de croissance, effectuées microscopiquement, montrent que celui-ci est accéléré au bout de 25 à 30 minutes d'action de l'auxine. Ce résultat semble en contradiction avec celui de Ray et Ruesink [29] qui trouvent un temps de latence de 10 à 15 minutes ; mais la variété d'Avoine qu'ils utilisent, a un taux de croissance qui est trois fois plus élevé que celui de la variété d'Avoine employée au cours de notre étude. Il est donc permis d'avancer que ces deux manifestations sont au moins concomitantes. Une étude cinétique beaucoup plus fine de l'action de l'auxine sur la synthèse de l'ARN soluble serait nécessaire mais elle risque d'être difficilement réalisable étant donné les différences relativement faibles qui doivent être mesurées.

Cependant les observations des effets de l'auxine sur les mouvements de cyclose du protoplasme risquent de rendre cette question caduque. En effet, il a été montré que l'auxine provoque en moins d'une minute une stimulation du taux de cyclose [34]. Une réponse aussi rapide ne peut être le résultat d'un processus ADN - - → ARN ——→ enzymes. Ce phénomène est à rapprocher de ceux qui ont été mis en évidence chez des organismes animaux. Ainsi, des injections d'œstrogène et de gluco-corticoïdes provoquent, en moins d'une minute, une accélération de la circulation sanguine au niveau, respectivement, de l'utérus et du foie, alors que la synthèse d'ARN n'est décelable qu'une ou plusieurs heures après l'injection. L'analogie avec l'action de l'auxine sur les coléoptiles est frap-

pante. L'existence de ces phénomènes dont le déclenchement est si rapide est difficile à interpréter. Il faut cependant noter que d'après Sweeney et Thimann [34], l'auxine peut inhiber, à certaines concentrations, les mouvements de cyclose du protoplasme. Or ces concentrations sont précisément celles qui provoquent une croissance maximale. Il est donc possible de se demander s'il existe une relation entre l'action de l'auxine sur l'élongation cellulaire et celle sur le taux de cyclose du protoplasme. Ce dernier problème devrait donc être repris, notamment par l'emploi d'analogues structuraux inactifs sur la croissance ; cela permettrait d'incriminer ou de rejeter une action physico-chimique qui serait indépendante de l'action biologique.

L'emploi d'inhibiteurs de synthèse d'ARN ou de protéines ont conduit de nombreux auteurs à la conclusion que l'auxine interviendrait dans la synthèse d'une ou de plusieurs protéines indispensables pour la croissance et cela par l'intermédiaire d'un ARN spécifique. Or nos résultats montrent que l'auxine provoque une stimulation précoce de la synthèse de l'ARN soluble. Cependant, d'après Key et Ingle [18], seul l'ARN messager serait un facteur limitant de la croissance induite par l'auxine. Cette conclusion semble beaucoup plus logique car l'on voit mal comment l'ARN soluble pourrait être un facteur limitant. Mais comme nous l'avons déjà souligné la conclusion de Key et Ingle ne pourrait être que partiellement exacte : l'ARN soluble semble, comme l'ARN messager, peu modifié par l'action de la 5-fluoro-uracile [5, 21]. Une étude extensive de l'action de la 5-fluoro-uracile semble donc nécessaire pour permettre d'aborder le rôle respectif de ces deux types d'ARN dans la croissance induite par l'auxine.

Nous tenons à remercier les Professeurs F. Gros et L. Hirth pour les conseils et facilités qu'ils ont bien voulu nous prodiguer tout au long de ce travail.

Summary.

The kinetics of the incorporation of ^{32}P labelled phosphate into the RNA of oat coleoptile sections and the influence of indoleacetic acid on this incorporation have been studied.

The kinetics have shown a lag phase of 40 minutes before the incorporation of phosphate into RNA started.

The coleoptiles have been preincubated for 0, 1, 4 or 9 hours in non radioactive medium with or without IAA and then incubated for 1 hour in the same media containing ^{32}P. With IAA $5.7.10^{-5}$ Molar, a transient stimulation of the rate of incorporation into the sRNA was observed and found to be maximum after 1 hour of preincubation with IAA. The distribution of radioactivity among the four nucleotides has shown that this stimulation was due to a synthesis of the sRNA. IAA $2.85.10^{-3}$ Molar immediately reduced the rate of incorporation into rRNA ; as with the previous concentration, the stimulation of the incorporation into sRNA was again observed.

Zusammenfassung.

Die kinetische Untersuchung des Einbaus von $H_3{}^{32}PO_4$ in die RNS-Segmente der Hafer-Koleoptile weist eine Verzögerungsphase im Einbau des Vorläufers, die 40 Minuten dauert, nach.

Die Gegenwart von AIA in dem Inkubationsmedium ruft starke Anderungen der Einbaugeschwindigkeit des Vorläufers in die verschiedenen RNS, welche durch Zentrifugieren im Dichtegradient getrennt werden, hervor. Bei $5{,}7.10^{-5}$ M induziert das AIA eine vorbübergehende Anregung dieser Geschwindigkeit in die lösliche RNS. Die Analyse der Radioaktivitätsverteilung in den Nukleotiden zeigt, dass es sich um eine Anregung der Synthese dieser RNS und nicht um eine Beschleunigung der Erneuerung des Endtriplets pCpCpA handelt. Bei $2{,}85.10^{-3}$ M ruft das AIA, ausser der vorhergehenden Wirkung, eine bedeutsame Hemmung des Einbaus des Vorläufers in die Ribosomen-RNS hervor.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse im Zusammenhang mit der Wirkungsweise des Auxins wird besprochen.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Basler, E. et Hansen, T. L. — *Bot. Gaz.*, 1964, **125**, 50.
2. Basler, E. et Nakazawa, K. — *Bot. Gaz.*, 1961, **122**, 228.
3. Burton, K. — *Biochem. Jour.*, 1956, **62**, 315.
4. Cherry, J. H. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1962, **55**, 487.
5. Cherry, J. H. et van Huyste, R. — *Plant Physiol.*, 1965, **40**, 987.
6. Chroboczeck, H. et Cherry, J. H. — *J. Mol. Biol.*, 1966, **19**, 28.
7. Click, R. E. et Hackett, D. C. — *Proceed. Natl. Acad. Sc.*, 1963, **50**, 243.
8. Click, R. E. et Hackett, D. C. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1966, **129**, 74.
9. Douce, R. — Communication personnelle.
10. Esnault, R. — *Bull. Soc. Franc. Physiol. Végét.*, 1965, **11**, 55.
11. Galibert, F., Lelong, J. L., Larsen, C. J. et Boiron, M. — *J. Mol. Biol.*, 1966, **21**, 385.
12. Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C. G., Rosebrough, W. et Watson, J. D. — *Nature*, 1961, **190**, 581.
13. Hamilton, T. H., Moore, R. J., Rumsey, A. F. et Schrank, A. R. — *Nature*, 1965, **208**, 1180.
14. Ingle, J. et Key, J. L. — *Plant Physiol.*, 1965, **40**, 1212.
15. Ingle, J., Key, J. L. et Holm, R. E. — *J. Mol. Biol.*, 1965, **11**, 730.
16. Key, J. L. — *Plant Physiol.*, 1964, **39**, 365.
17. Key, J. L. — *Plant Physiol.*, 1966, **41**, 1257.
18. Key, J. L. et Ingle, J. — *Proceed. Nat. Acad. Sc.*, 1964, **52**, 1382.
19. Key, J. L. et Shannon, J. C. — *Plant Physiol.*, 1964, **39**, 360.
20. Knypl, J. S. — *Nature*, 1965, **206**, 844.
21. Leaver, C. J. et Key, J. L. — *Proceed. Nat. Acad. Sc.*, 1967, **57**, 1338.
22. Mandell, J. D. et Hershey, A. D. — *Anal. Biochem.*, 1960, **1**, 66.
23. Masuda, Y. et Wada, S. — *Physiol. Plantar.*, 1966, **19**, 1055.
24. Nitsch, J. P. et Nitsch, C. — *Plant Physiol.*, 1956, **31**, 94.
25. Nooden, L. D. et Thimann, K. V. — *Proceed. Nat. Acad. Sc.*, 1963, **50**, 194.
26. Nooden, L. D. et Thimann, K. V. — *Plant Physiol.*, 1965, **40**, 193.
27. Nooden, L. D. et Thimann, K. V. — *Plant Physiol.*, 1966, **41**, 157.
28. Penny, P. et Galston, A. W. — *Amer. Jour. Bot.*, 1966, **53**, 1.
29. Ray, P. M. et Ruesink, A. W. — *Develop. Biol.*, 1962, **4**, 377.
30. Rosset, R. et Monier, R. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, **68**, 653.
31. Schleich, T. et Goldstein, J. — *J. Mol. Biol.*, 1966, **15**, 136.
32. Shannon, J. C., Hanson, J. B. et Wilson, C. M. — *Plant Physiol.*, 1964, **39**, 804.
33. Silberger, J. et Skoog, F. — *Science*, 1952, **118**, 443.
34. Sweeney, B. M. et Thimann, K. V. — *J. Gen. Physiol.*, 1938, **21**, 439.
35. Tester, C. F. et Dure, L.S. — *Biochem.*, 1967, **6**, 2532.
36. Trewasas, A. J., Johnston, I. R. et Crook, E. M. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1967, **136**, 301.
37. Truelsen, T. A. et Galston, A. W. — *Physiol. Plantar.*, 1966, **19**, 167.
38. Virmaux, N., Mandel, P. et Urban, P. F. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, **16**, 308.

IMPRIMERIE M. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.

Printed in France.